

알칼리 내성 *Bacillus* sp.속 유래 Promoter의 발현특성

박희경 · 박영서 · 김진만 · 유주현*

연세대학교 공과대학 식품공학과

Studies on the Properties of the Promoter from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp.

Park, Hee-Kyoung, Young-Seo Park, Jin-Man Kim and Ju-Hyun Yu*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — The promoter isolated from an alkali-tolerant *Bacillus* sp. chromosomal DNA was subcloned. The activity of promoter in *B. subtilis* and alkali-tolerant *Bacillus* sp. began to increase at the early stage of spore formation. In the presence of 1% glucose, the promoter activity repressed and was recovered by addition of c-GMP in the medium.

*Bacillus*속 미생물은 특정 환경하에서 내생 포자를 형성하는 세균으로서 이와 관련된 복잡한 분화과정의 연구대상으로, 또한 외래 유용 유전자의 효율적 발현과 분비를 위한 목적으로서 이용되어져 왔다(1-3).

*Bacillus subtilis*에서의 유전자 발현은 분화시기에 따라 분자량이 서로 다른 sigma subunit와 core RNA polymerase의 결합체인 RNA polymerase가 promoter내의 특이적 업기배열과 상보적으로 결합하는 전사단계에서 조절되어진다(3,4).

따라서 *Bacillus*속 내에서 외래 유전자가 효율적으로 발현되기 위해서는 세포내 RNA polymerase가 인식할 수 있는 적합한 promoter가 요구되어진다. Yu 등은 *Bacillus* promoter probe vector, pPL703(5)을 이용하여 알칼리 내성 *Bacillus* sp. chromosomal DNA로부터 포자형성 단계에서 발현 조절되어지는 promoter를 cloning하여 생화학적 특성을 조사한 바 있다(6-8).

본 연구에서는 promoter 단편을 함유한 재조합 plasmid를 subcloning한 후 *B. subtilis*와 공여균주에서 그 발현특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주, 배지와 plasmid

숙주균주로서는 *B. subtilis* 207-25(9)와 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14(8)를 사용하였다. Plasmid는 promoter probe vector, pPL703과 bacteriophage SPO2 유래의 promoter를 함유한 pPL708(5) 및 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA로부터 분리된 promoter 단편이 삽입되어 있는 p12BS(10)를 사용하였다.

B. subtilis 207-25 원형질체 형질전환에는 PAB 배지를 사용하였고 재생배지로는 DM-3 배지를 사용하였다. *Bacillus* sp. YA-14 competent cell 형질전환(11)에는 SPI 배지가 사용되었으며 형질전환체의 선별과 CAT(chloramphenicol acetyl transferase) 활성측정에는 각 항생물질이 첨가된 LB 배지를 사용하였다.

재조합 plasmid의 제조 및 형질전환

재조합 plasmid의 신속분리는 Doi(12)의 방법을 사용하였고 모든 DNA 제조에는 Maniatis 등(13)의 방법에 따라 행하였다. *B. subtilis*의 원형질체 형질전환은 Chang과 Cohen의 방법에 따라 행하였으며 *Bacillus* sp. YA-14는 competent cell 형질전환 방법에

Key words: promoter, catabolite repression, sporulation

*Corresponding author

의했다.

CAT 활성측정

Promoter의 활성측정은 Show(14) 등의 방법에 따라 CAT의 1 unit는 37C에서 분당 acetylation되는 chloramphenicol의 mol수로 나타내었다.

결과 및 고찰

p12BS promoter 유전자의 subcloning

Promoter 활성을 갖는 0.9 kb DNA 단편을 함유하는 plasmid p12BS내에는 3개의 *MboI* 인식부위가 존재한다(Fig. 1). p12BS를 *BamHI*과 *PstI*으로 절단

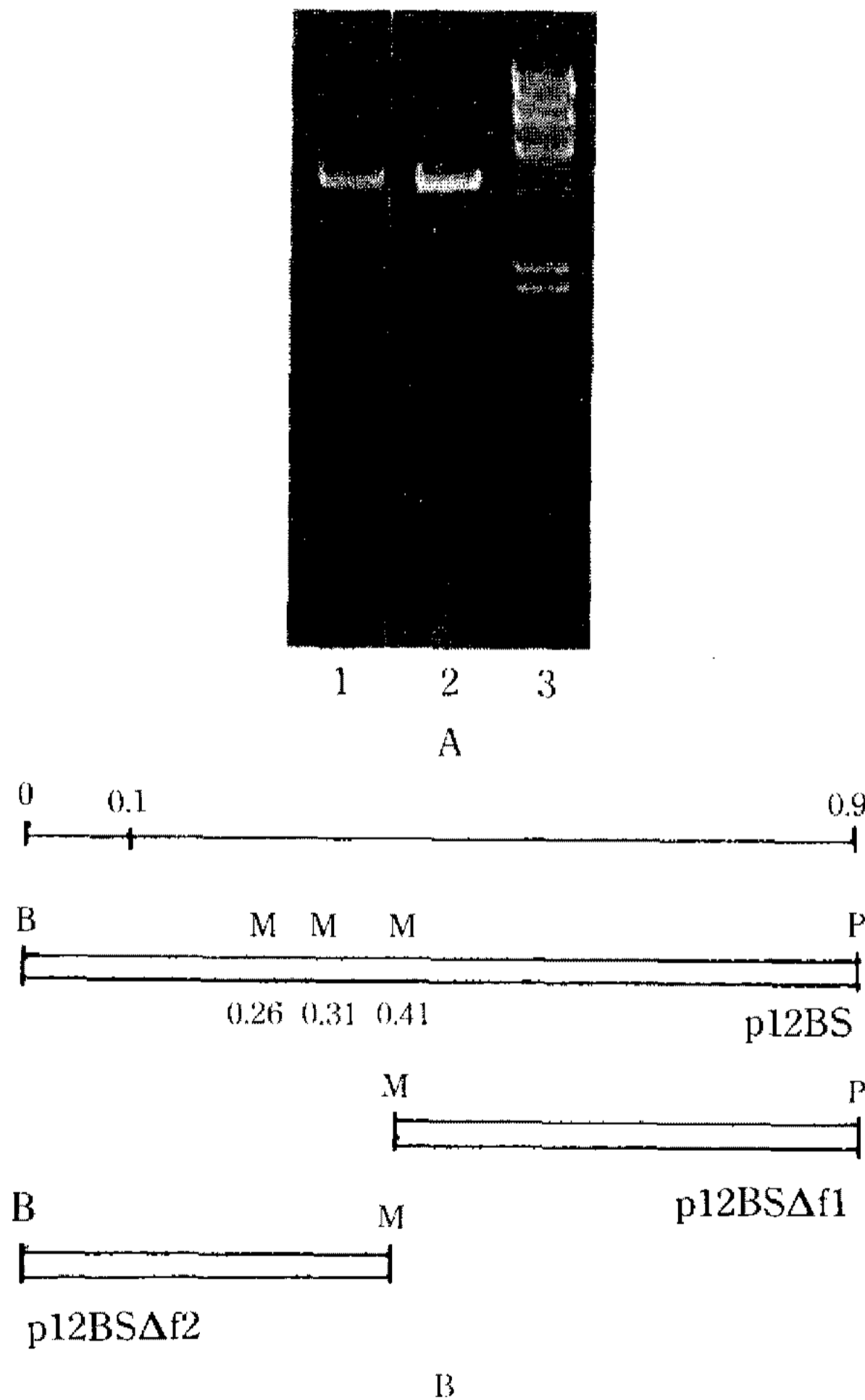


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis and restriction map of p12BSΔf1 and p12BSΔf2.
 Panel(A) lane 1: p12BSΔf1 digested with *EcoRI* & *PstI*; lane 2: p12BSΔf2 digested with *ExoRI* & *PstI*; lane 3: λDNA digested with *HindIII* as α molecular weight marker
 Panel(B) The distance care in kb
 B: *BamHI* S: *SalI* E: *EcoRI* M: *MboI*

하여 전기영동한 후 electroelution를 이용하여 0.9 kb DNA 단편을 회수하였다. 0.9 kb DNA를 *MboI*으로 절단하여 promoter probe vector, pPL703을 *BamHI*으로 절단한 plasmid와 *BamHI*과 *PstI*으로 절단한 plasmid에 각각 ligation시켜 원형질체 형질전환법으로 형질전환시켰다. 형질전환체 중 chloramphenicol에 내성을 보이는 균주들로부터 plasmid DNA를 분리하여 전기영동으로 확인하였다(Fig. 1).

*BamHI*과 *PstI*으로 절단된 pPL703에 0.5 kb의 DNA 단편이 삽입되어진 재조합 plasmid를 p12BSΔf1으로, *BamHI*으로 절단된 pPL703에 0.4 kb의 DNA 단편이 삽입되어진 재조합 plasmid를 p12BSΔf2로 명명하였다(Fig. 2).

재조합 plasmid p12BSΔf1과 p12BSΔf2를 함유한 *B. subtilis*와 *Bacillus* sp. YA-14에서의 CAT 비활성

p12BSΔf1을 함유하는 *B. subtilis* 207-25를 0.1% 또는 1%의 glucose가 첨가된 LB 배지에서 진탕배양시키면서 세포성장이 진행되어감에 따라 시료를 추출하여 CAT 활성을 측정함으로써, plasmid내에 삽입된 promoter의 활성을 살펴보았다. CAT 비활성이 배양 8시간에서 가장 높게 나타난 결과로부터 sub-

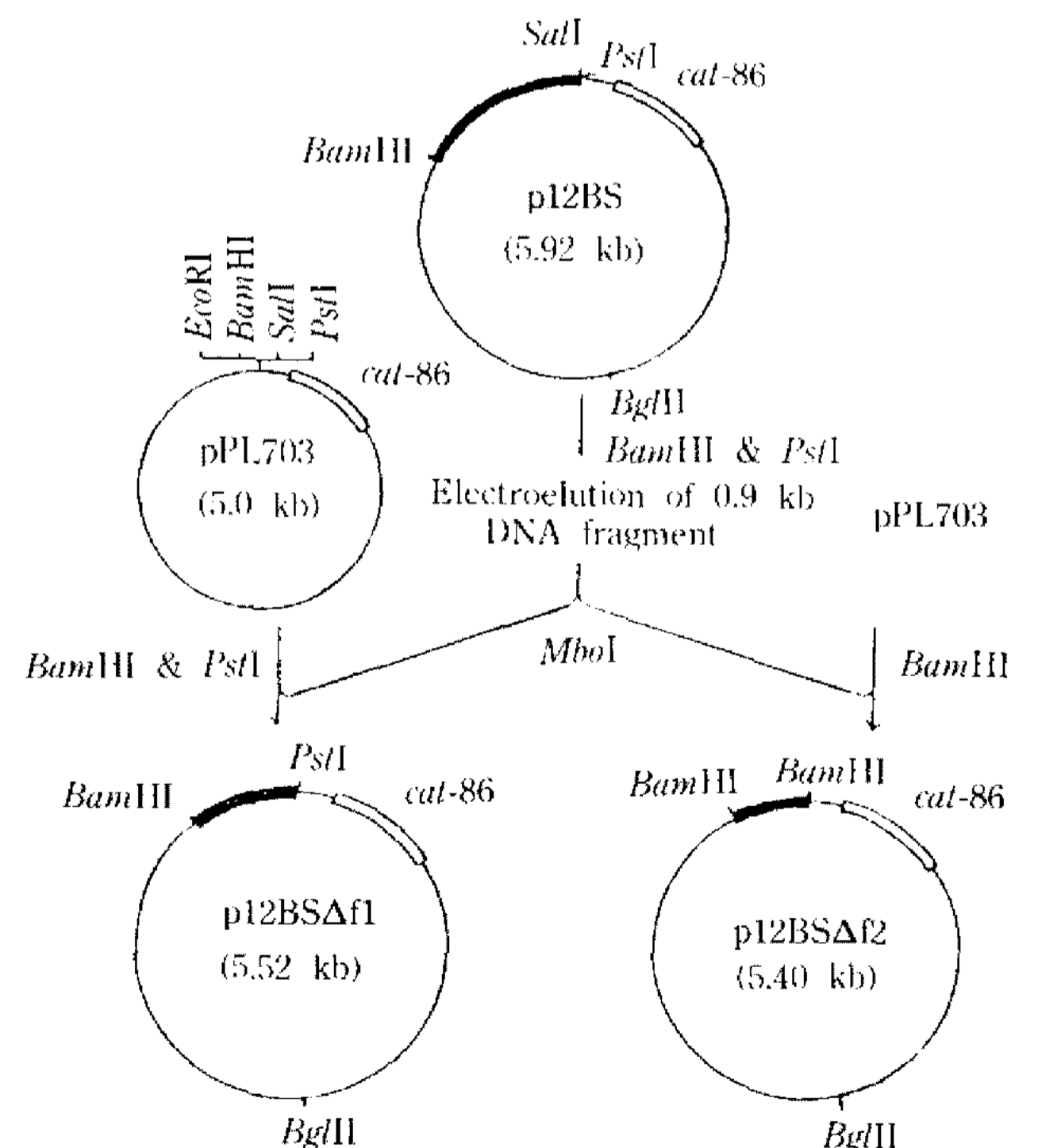


Fig. 2. Construction of p12BSΔf1 and p12BSΔf2 from p12BS and pPL703.

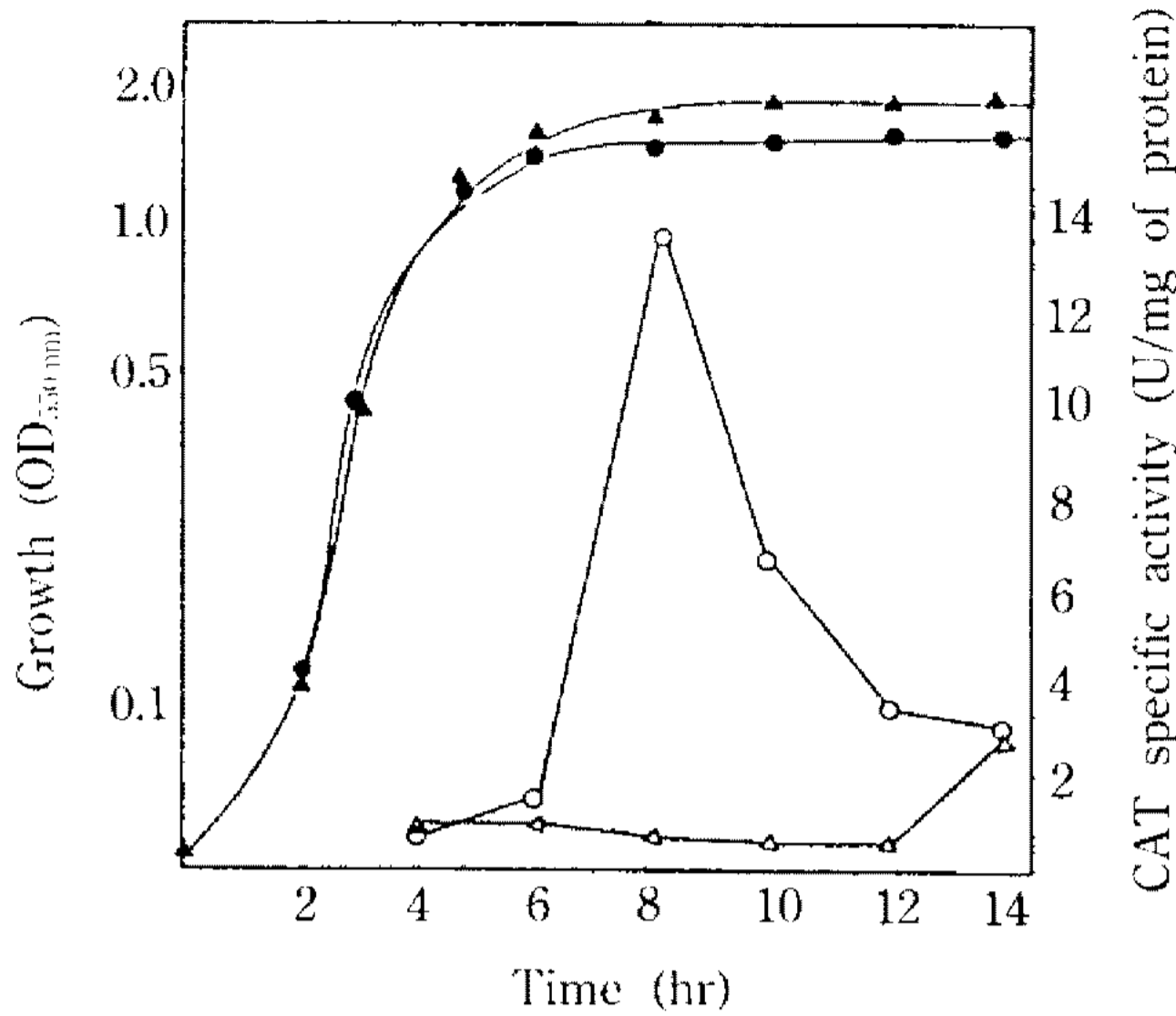


Fig. 3. CAT specific activity as a function of growth and effect of glucose concentration on CAT specific activity in *B. subtilis* 207-25 harboring p12BSΔf1.

●—: cell growth in LB containing 0.1% glucose
 ▲—: cell growth in LB containing 1.0% glucose
 ○—: CAT activity in LB containing 0.1% glucose
 △—: CAT activity in LB containing 1.0% glucose

lone된 promoter가 내생포자 형성에 관련된 promoter임을 알 수 있었으며, 0.1%의 glucose가 첨가된 경우와 1% glucose가 첨가된 경우를 비교해 보았을 때 1%가 첨가된 경우에 CAT 비활성이 크게 감소되어졌다. 이 결과로부터 p12BSΔf1의 promoter내에 catabolite repression에 관련된 염기배열이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3, 4).

p12BS의 경우처럼 chloramphenicol(10 μg/ml)의 첨가에 의해서 10배 이상의 유도효과가 있었으며 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14에서도 유사한 결과를 얻었다(Table 1). p12BSΔf2가 함유된 *B. subtilis* 207-25를 동일한 조건으로 배양하였을 때 promoter의 활성이 나타나지 않는 것으로 미루어 promoter region이 p12BSΔf1의 0.5 kb내에 존재함을 알 수 있었다.

c-GMP 첨가에 의한 catabolite repression 억제 효과

*B. subtilis*가 생산하는 α-amylase, protease 등의 효소합성이 glucose에 의해 repression되며 포자형성에 관련된 많은 현상이 catabolite repression에 의해 조절되어진다고 보고되어 있다(15). *E. coli*에서는 이러한 repression에 c-AMP와 catabolite gene activator

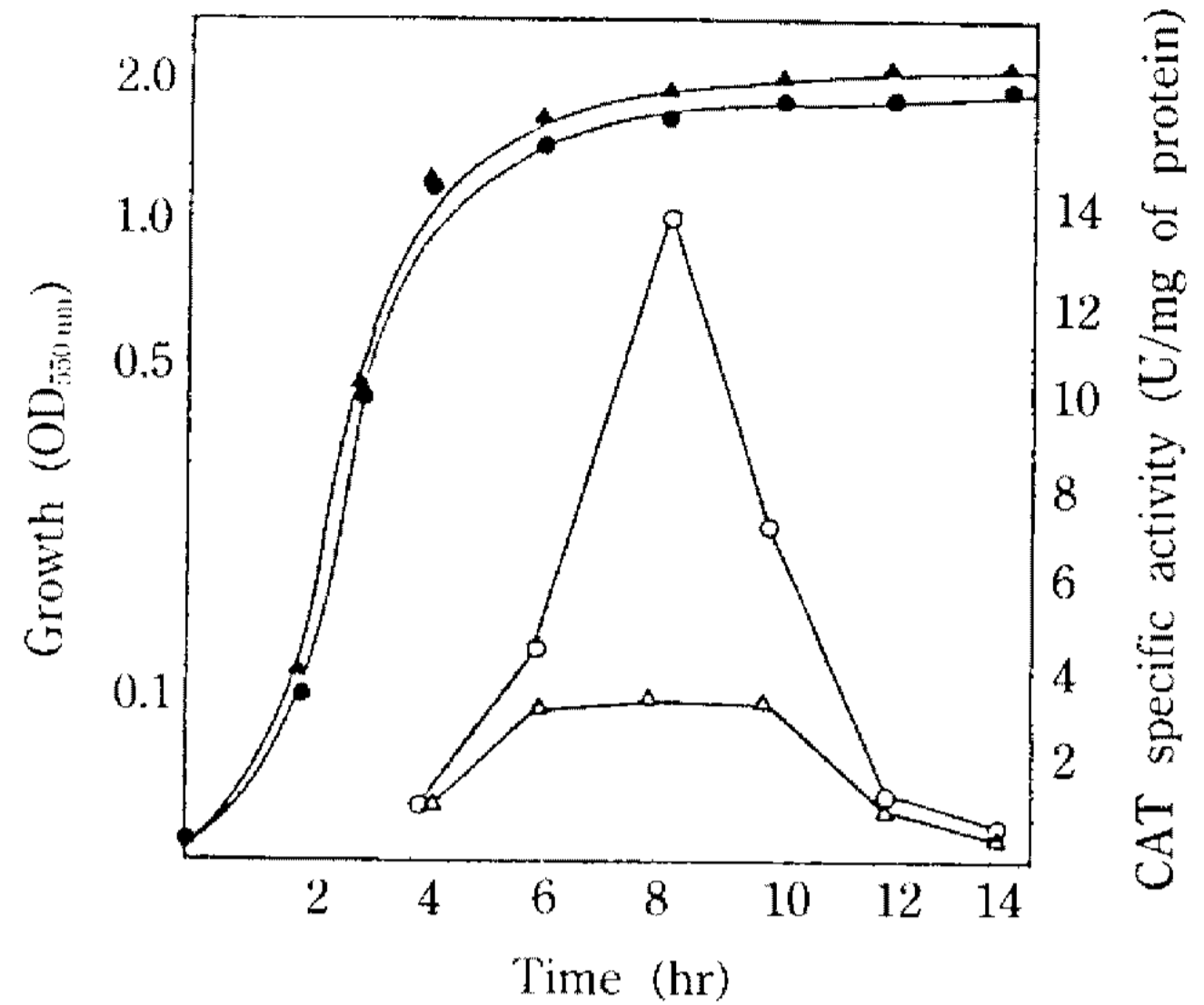


Fig. 4. CAT specific activity as a function of growth and effect of glucose concentration on CAT specific activity in *Bacillus* sp. YA-14 harboring p12BSΔf1.

●—: cell growth in LB containing 0.1% glucose
 ▲—: cell growth in LB containing 1.0% glucose
 ○—: CAT activity in LB containing 0.1% glucose
 △—: CAT activity in LB containing 1.0% glucose

Table 1. Induction of CAT with chloramphenicol

Strain	Plasmid	CAT specific activity (U/mg of protein)	
		Uninduced	Induced
<i>B. subtilis</i> 207-25	pPL708	0.6	4.2
<i>B. subtilis</i> 207-25	p12BS	0.5	14.3
<i>B. subtilis</i> 207-25	p12BSΔf1	0.5	13.9
<i>B. subtilis</i> 207-25	p12BSΔf2	0.2	0.23
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	pPL708	0.7	3.9
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	p12BS	0.8	15.2
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	p12BSΔf1	0.9	14.1

protein(CAP)이 관련된다고 알려져 있으나, *Bacillus*에서는 c-AMP도 c-AMP의 합성에 관계하는 효소도 존재하지 않는다는 연구와 c-GMP 첨가에 의해 catabolite repression이 해제되어 효소나 항생물질 등의 생산성이 향상되어졌다는 보고로부터(16) p12BSΔf1 promoter의 repression 현상도 c-GMP에 의해 억제될 수 있다고 추측하였다. p12BSΔf1을 함유한 *B. subtilis*를 1%의 glucose가 첨가된 LB 배지에 배양시킨 후 glucose의 잔존량이 0%에 이르는 배양 12시간째에 Fig. 5에서와 같이 각각의 성분을 첨가하여 그 영향을 알아보았다. c-GMP가 첨가되지 않은 경우

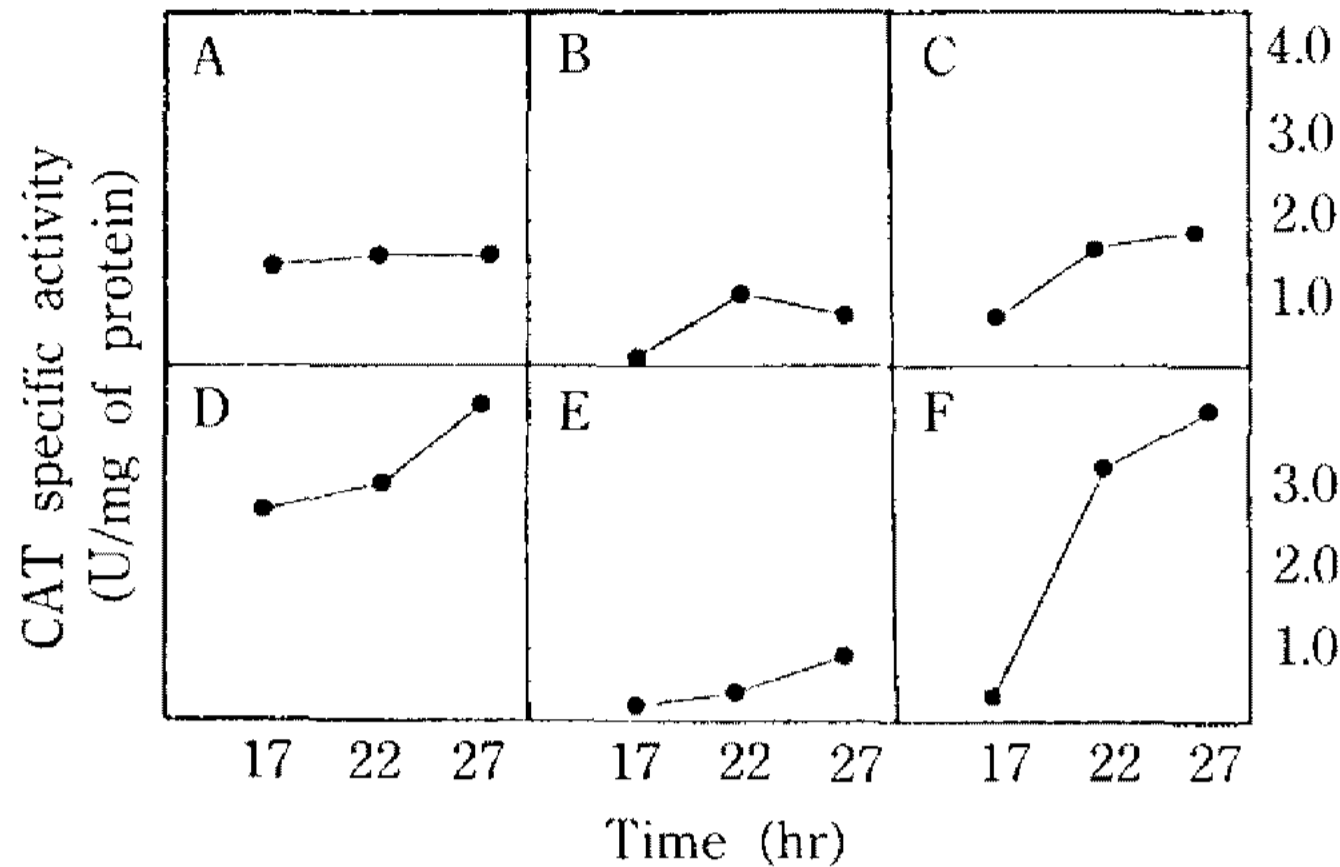


Fig. 5. Effect of c-GMP and c-AMP on the CAT activity under condition of glucose repression.

A: Chloramphenicol

B: Glucose

C: Chloramphenicol and glucose

D: Chloramphenicol and c-GMP

E: Chloramphenicol and c-AMP

F: Chloramphenicol, c-GMP and glucose

Cell was grown in LB medium containing 1% glucose. Addition was made to the culture 12 h after incubation: glucose was added at 83.3 mM and c-GMP or c-GMP or c-AMP at 5 mM.

(panel A, B, C)보다 c-GMP가 첨가된(panel D, F) 경우 4배 이상의 CAT 활성이 증가하였으며 c-AMP가 첨가된 경우(panel E) CAT 활성에는 변화가 없었다. 이상의 결과는 c-GMP가 *Bacillus*속 내에서 catabolite repression에 관련된 인자임을 입증하는 한 예가 될 수 있다.

요 약

알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA로부터 분리된 promoter를 subcloning하여 생화학적 특성을 조사하였다. *B. subtilis*와 promoter 공유균주, *Bacillus* sp. YA-14에서 promoter의 활성은 포자형성 초기단계에서 급격히 증가하였으며 1.0% (w/v) glucose 첨가로 promoter 활성이 억제되었고 c-GMP에 의해 저해되었던 활성이 증가하였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Doi, R.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 772 (1982).
2. Losick, R. and J. Pero: *Cell*, **15**, 582 (1981).
3. Johnson, W.C., C.P. Jr. Moran and R. Losick: *Nature* (London), **302**, 800 (1983).
4. Moran, C.P., N. Lang, S.F.J. Le Grice, G. Kee, M. Stephens, A.L. Sonnenshein, J. Pero and R. Losick: *Mol. Gen. Genet.* **196**, 339 (1982).
5. Williams, D.M., E.J. Duvall and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.* **146**, 1162 (1981).
6. Yu, J.H., B.T. Koo, I.S. Kong, Y.J. Chung and Y.S. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 126 (1988).
7. Yu, J.H., B.T. Koo, Y.S. Park, Y.J. Chung, D.H. Bai and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 343 (1988).
8. Yu, J.H., B.T. Koo and Y.J. Chung: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 188 (1989).
9. Chang, Sand S.N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111 (1978).
10. Yu, J.H., Y.S. Park, B.T. Koo, J.M. Kim, and H.K. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 429 (1990).
11. Bott, K.F. and G.A. Wilson: *J. Bacteriol.*, **94**, 562 (1967).
12. Goldgarb, D.S., R.L. Rodriguez and R.H. Doi: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 5886 (1982).
13. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
14. Shaw, W.V.: *Method's Enzymology*, **43**, 737 (1975).
15. Rickenberg, H.V.: *Annu. Rev. Microbiol.* **28**, 353 (1974).
16. Malumdar, S and K.B. Susil: *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2583 (1985).

(Received October 12, 1990)